

*SIRT6*基因沉默对人肝癌细胞凋亡的影响及其机制研究

周洪钟 陶娜娜 陈祥 任吉华 李宛蔚 刘波 陈娟*

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文旨在探讨慢病毒介导的沉默信息调节因子6(silent information regulator 6, *SIRT6*)基因沉默对人肝癌细胞凋亡的影响及其机制。逆转录PCR(RT-PCR)和Western blot分别检测人肝癌细胞系(SK-Hep-1、Huh-7、PLC/PRF/5、HepG2)和永生化肝细胞系(MIHA)中*SIRT6*基因的表达水平;利用慢病毒介导的shRNA干扰技术靶向沉默*SIRT6*的表达,并通过RT-PCR和Western blot验证其沉默效率;流式细胞术检测*SIRT6*基因沉默对人肝癌细胞凋亡的影响,进一步应用RT-PCR和Western blot检测*SIRT6*基因沉默对凋亡抑制蛋白基因(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族mRNA和蛋白质水平的影响;最后,应用流式细胞术分析X连锁凋亡抑制蛋白基因(X-linked inhibitor of apoptosis protein gene, *XIAP*)在*SIRT6*基因沉默诱导的肝癌细胞凋亡中的作用。结果显示,*SIRT6*基因在人肝癌细胞系中表达上调;慢病毒介导的shRNA能抑制人肝癌细胞中*SIRT6*基因的表达;沉默*SIRT6*基因的表达能诱导人肝癌细胞凋亡,并降低*XIAP*的mRNA和蛋白质水平;过表达*XIAP*能逆转*SIRT6*基因沉默所诱导的人肝癌细胞凋亡。该研究结果提示,*SIRT6*基因沉默可能通过调节*XIAP*的表达从而诱导人肝癌细胞凋亡。

关键词 肝细胞癌; *SIRT6*; *XIAP*; 细胞凋亡

Effects of *SIRT6* Gene Silencing on the Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells and Its Potential Mechanisms

Zhou Hongzhong, Tao Nana, Chen Xiang, Ren Jihua, Li Wanyu, Liu Bo, Chen Juan*

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study investigated the effects of lentivirus-mediated silent information regulator 6 (*SIRT6*) knock-down on cell apoptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) cells and its potential mechanisms. The expression of *SIRT6* gene in HCC cell lines (SK-Hep-1, Huh-7, PLC/PRF/5, HepG2) and immortalized human liver cell line (MIHA) was detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. *SIRT6* gene was silenced by lentivirus-mediated shRNA interference technology and its efficiency of *SIRT6* gene silencing was detected by RT-PCR and Western blot. Effects of *SIRT6* gene silencing on apoptosis in SK-Hep-1 and Huh-7 cells were analyzed by flow cytometry. The mRNA and protein levels of IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) family were analyzed by RT-PCR and Western blot, respectively. Effects of *XIAP* (X-linked inhibitor of apoptosis protein gene) on the induction of apoptosis in *SIRT6*-depleted SK-Hep-1 cells were analyzed by flow

收稿日期: 2016-01-05 接受日期: 2016-02-18

国家自然科学基金(批准号: 81472271、81270559)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68486780, E-mail: yixin_xinyuan@163.com

Received: January 5, 2016 Accepted: February 18, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472271, 81270559)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68486780, E-mail: yixin_xinyuan@163.com

网络出版时间: 2016-04-08 17:13:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160408.1713.006.html>

cytometry. Our results showed that *SIRT6* was over-expressed in HCC cells. Lentivirus-mediated shRNA interference down-regulated the protein level of *SIRT6* in the HCC cells. Knockdown of *SIRT6* gene induced the apoptosis of HCC cells and down-regulated the mRNA and protein levels of XIAP. XIAP over-expression significantly abolished the induction of apoptosis in *SIRT6*-depleted cells. Together, these data indicated that *SIRT6* gene silencing might induce cell apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating XIAP protein level.

Keywords hepatocellular carcinoma; *SIRT6*; XIAP; apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的消化道恶性肿瘤,具有侵袭性强、易转移、预后差等特点,其死亡率在恶性肿瘤中高居第二。大部分肝细胞癌患者在确诊时已失去根治性手术治疗的良机^[1],目前常用的抗肿瘤药索拉非尼(Sorafenib)^[2]、阿霉素等临床治疗效果不甚理想,外科手术治疗也存在低切除率、高复发率的风险。因此,本课题通过分析沉默信息调节因子6(silent information regulator 6, *SIRT6*)在HCC中的功能,将有助于阐明HCC发生发展的机制,进而有助于肝癌的诊断、治疗及预后。

沉默信息调节因子(silent information regulation, Sirtuin)家族是依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的第三类组蛋白去乙酰化酶,人类Sirtuin家族包括7个成员:即SIRT1-7。它们具有高度保守的催化核心结构域^[3],在细胞中的定位各有不同:SIRT1、SIRT6、SIRT7主要定位于细胞核,SIRT3、SIRT4和SIRT5主要定位于线粒体,而SIRT2主要定位于细胞质中^[4]。近年来,SIRT6在肿瘤中的作用越来越受到人们的重视。有研究发现,其结构与其他Sirtuin蛋白质成员不同,无保守的高度灵活的NAD⁺结合环^[5],却能使底物H3K9、H3K56等发生去乙酰化^[6];还有研究发现,SIRT6参与细胞凋亡、DNA损伤和修复^[5],阻断核转录因子-kappa B(nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)信号转导来影响基因组的稳定性和衰老^[7]等。虽然SIRT6参与多个生命调控过程,并与多种疾病有关系,但其具体机制不清,而目前关于SIRT6在肝癌中发生作用的报道很少,因此,本研究将初步探讨*SIRT6*基因沉默对肝癌细胞凋亡的影响,并进一步分析*SIRT6*调控HCC凋亡的分子机制,从而为临床分子靶向治疗肝癌提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系SK-Hep-1、PLC/PRF/5、HepG2

均购自ATCC(American Type Culture Collection),人肝癌细胞系Huh-7购自The Health Science Research Resources Bank(Osaka, Japan),永生化肝细胞系MIHA由香港中文大学柯子斌教授惠赠。pCMV6-XL5和pCMV6-XL5-XIAP质粒均购自Origene公司。shSIRT6慢病毒购自GeneChem公司(上海)。shSIRT6-1和shSIRT6-2序列分别为:5'-GCT ACG TTG ACG AGG TCA TGA-3'和5'-GCA ACA AGA TGA AGA GCA CCA A-3';shCont序列为:5'-GCA ACA AGA TGA AGA GCA CCA A-3'。SIRT6抗体(NB-100-2522)购自Novus Biologicals公司。XIAP抗体(#2045)购自Cell Signaling Technology公司。辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG和GAPDH抗体均购自北京中杉金桥生物技术公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG购自GE Healthcare公司。质粒转染试剂(06366546001)和siRNA转染试剂Lipofectamine 2000分别购自Roche和Invitrogen公司。Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(C1063)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

SK-Hep-1、Huh-7、PLC/PRF/5、HepG2均培养于含10%胎牛血清(Gibco)、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基(Gibco公司)中,于37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的孵育箱中培养。质粒转染和siRNA转染严格按照说明书操作。

1.3 Western blot

收集经过处理的细胞,用PBS洗涤1次后,根据细胞数加入相应体积的细胞裂解液RIPA(含PI),4 $^{\circ}$ C摇床摇20 min,16 000 \times g离心5 min并去除细胞碎片;用BCA法测定蛋白质浓度;取等质量总蛋白(30 μ g),95 $^{\circ}$ C变性10 min,经10% SDS-PAGE电泳分离蛋白质后,在Bio-Rad湿转电泳槽中恒压90 V转膜3-4 h,将含有蛋白质的NC膜(RPN303D, GE)在5%脱脂奶粉中室温封闭1 h,一抗4 $^{\circ}$ C摇床过夜(SIRT6抗体1:4 000稀释, XIAP抗体1:2 000稀释);然后TBST洗膜3次,每次5 min;二抗室温摇床2 h, TBST洗膜3次,

每次5 min, ECL显影。以 β -actin作为内参。

1.4 RT-PCR检测

用Trizol(Invitrogen公司)裂解细胞提取总RNA, 利用iScript™ cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad公司)试剂盒将1 μ g RNA逆转录为cDNA, 然后利用Fast Start Universal SYBR Green Master(Roche公司)试剂盒进行RT-PCR, 以 β -actin为内参, 每组实验重复3次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达水平。RT-PCR引物信息见表1。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

SK-Hep-1和Huh-7细胞转染72 h后, 用PBS洗涤细胞, 加入适量胰酶消化, 及时加入培养基中和, 避免消化过度, 轻轻吹打细胞悬液。取 $(1\sim5)\times 10^5$ 细胞进行离心, 离心转速为800 r/min, 3 min后去掉培养基, 加入2 mL PBS重悬细胞, 800 r/min离心3 min。按照凋亡检测试剂盒说明书操作, 加入195 μ L Annexin-V结合液重悬细胞, 加入6 μ L Annexin-V、4 μ L PI, 轻轻吹打混匀, 室温避光孵育20 min, 立即进行流式细胞术检测细胞凋亡。

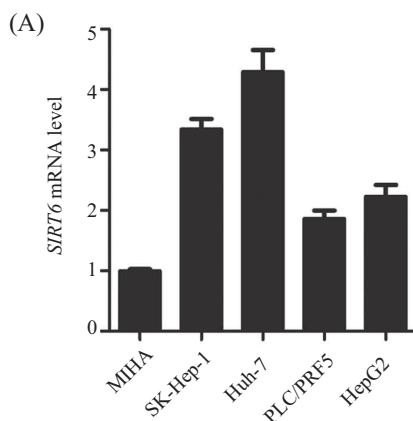
1.6 统计学分析

实验数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 形式表示, 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *SIRT6*在HCC细胞系中的表达

我们首先在人肝癌细胞系(SK-Hep-1、Huh-7、



A: RT-PCR检测*SIRT6* mRNA水平; B: Western blot检测*SIRT6*蛋白质水平。

A: *SIRT6* mRNA level was detected by RT-PCR; B: *SIRT6* protein level was detected by Western blot.

图1 RT-PCR和Western blot分别检测人肝癌细胞系和永生生化肝细胞系中*SIRT6* mRNA和蛋白质水平

Fig.1 The mRNA and protein level of *SIRT6* in hepatocellular carcinoma cell lines and the immortalized liver cell line were detected by RT-PCR and Western blot, respectively

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Sequences of RT-PCR primers

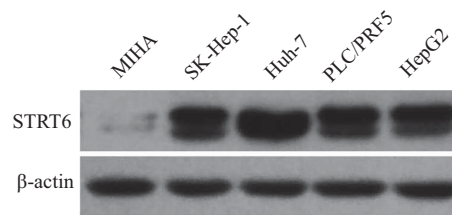
目的基因	引物序列
Target genes	Primer sequence
<i>HIAP-1</i>	F: 5'-TGG TCT TCT CCA GGT TCA AA-3' R: 5'-TGG TCT TCT CCA GGT TCA AA-3'
<i>HIAP-2</i>	F: 5'-CAA ATG GTT TCC AAG GTG TG-3' R: 5'-GGA CAA CAG CTG CTC AAG AA-3'
<i>XIAP</i>	F: 5'-GGA GGG CTA ACT GAT TGG AA-3' R: 5'-ATT TGC ACC CTG GAT ACC AT-3'
<i>ML-IAP</i>	F: 5'-CCA GCT GTC AGT TCC TGC T-3' R: 5'-CAG CTG GGA GTG AGT CTC C-3'
<i>Survivin</i>	F: 5'-CCC TGC CTG GCA GCC CTT TC-3' R: 5'-CTG GCT CCC AGC CTT CCA-3'
<i>ILP-2</i>	F: 5'-GAA GCC CGG CTC ATT ACT T-3' R: 5'-AGC TCT TGC AAG CTG CTC TT-3'
<i>NAIP</i>	F: 5'-CCA GAC AAC AAT GCC ACT TC-3' R: 5'-AAA TGC TCT GTC CGT CCT TT-3'
<i>BRUCE</i>	F: 5'-GAC ACT GCT CTG CAA ACT CC-3' R: 5'-AGA GCT GCT GTG CCT CTG TA-3'
β -actin	F: 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3' R: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'
<i>SIRT6</i>	F: 5'-GCA GTC TTC CAG TGT GGT GT-3' R: 5'-CCA TGG TCC AGA CTC CGT-3'

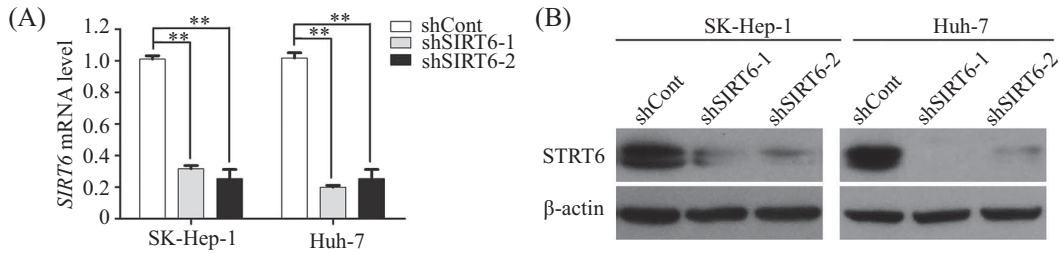
PLC/PRF/5和HepG2)和正常永生生化肝细胞系MIHA中检测*SIRT6*的表达, 以 β -actin为内参。RT-PCR和Western blot结果显示, *SIRT6*在HCC细胞系中的mRNA和蛋白质水平较永生生化肝细胞系MIHA明显升高(图1)。

2.2 RT-PCR和Western blot检测慢病毒介导的shRNA对*SIRT6*的抑制作用

为了验证两个靶向*SIRT6* shRNA的沉默效应, 我们将表达shCont、sh*SIRT6*-1、sh*SIRT6*-2的慢病

(B)



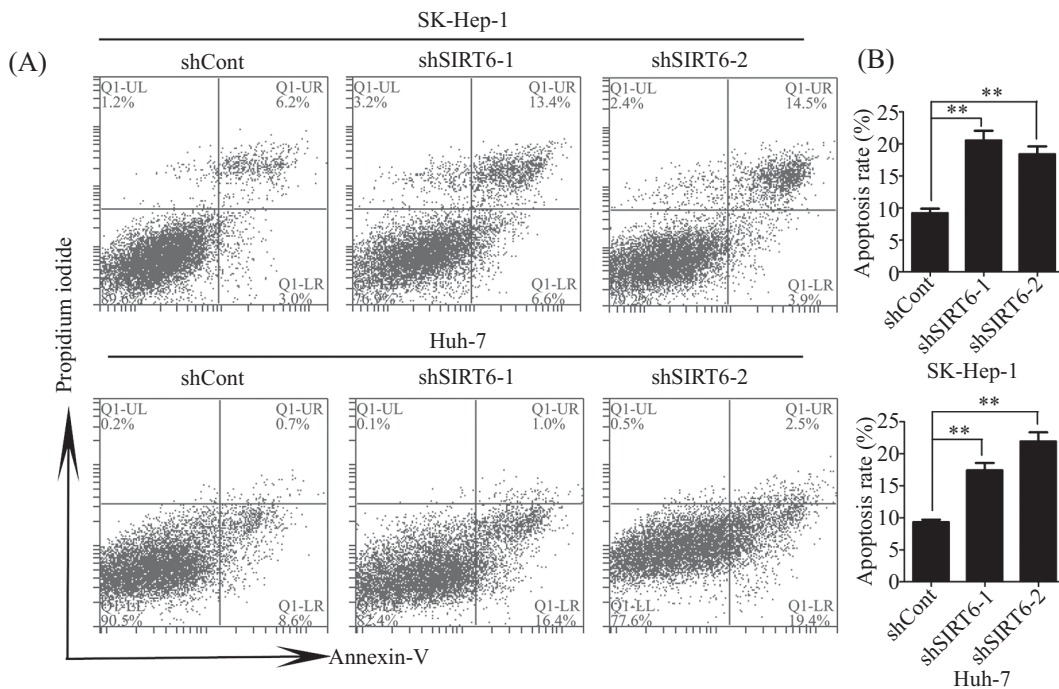


A: RT-PCR检测*SIRT6* mRNA水平; ** $P < 0.01$, 与shCont组比较。 B: Western blot检测*SIRT6*蛋白质水平。

A: *SIRT6* mRNA level was detected by RT-PCR; ** $P < 0.01$ vs shCont group. B: *SIRT6* protein level was detected by Western blot.

图2 RT-PCR和Western blot检测*SIRT6*基因沉默的效率

Fig.2 The efficiency of *SIRT6* gene silencing was detected by RT-PCR and Western blot, respectively



A: 流式细胞术检测细胞凋亡散点图。 B: 凋亡细胞比例图; ** $P < 0.01$, 与shCont组比较; 实验独立重复3次, 数据以mean±S.D.形式表示。

A: representative scatter plot detecting apoptosis by flow cytometry. B: percentage of apoptotic cells; ** $P < 0.01$ vs shCont group; Each point represents the mean±S.D. of three independent experiments.

图3 流式细胞术检测*SIRT6*基因沉默对SK-Hep-1和Huh-7细胞凋亡的影响

Fig.3 Effects of *SIRT6* gene silencing induced apoptosis in SK-Hep-1 and Huh-7 cells detected by flow cytometry

毒分别感染SK-Hep-1和Huh-7细胞。感染72 h后, 利用RT-PCR检测*SIRT6* mRNA水平, 在SK-Hep-1细胞中, 抑制率分别达68.3%和74.7%; 在Huh-7细胞中, 抑制率分别达80.0%和74.5%。*SIRT6* shRNA成功抑制了肝癌细胞中*SIRT6* mRNA水平($P < 0.01$, 图2A)。应用Western blot检测细胞中*SIRT6*蛋白质水平, 结果显示, 与shCont相比, shSIRT6-1和shSIRT6-2成功抑制了肝癌细胞中*SIRT6*蛋白质水平(图2B)。

2.3 *SIRT6*基因沉默可诱导人肝癌细胞凋亡

将表达shCont、shSIRT6-1、shSIRT6-2的慢病毒分别感染SK-Hep-1和Huh-7细胞, 72 h后收集细胞进行流式细胞术检测。结果显示, SK-Hep-1细胞中

shCont组的细胞凋亡比例为(9.2±1.2)%, shSIRT6-1和shSIRT6-2组的细胞凋亡比例分别为(20.5±2.64)%和(18.4±2.1)%; Huh-7细胞中shCont组的细胞凋亡比例为(9.3±0.7)%, shSIRT6-1和shSIRT6-2组的细胞凋亡比例分别为(17.4±2)%和(21.93±2.45)%; 与shCont组相比, SK-Hep-1和Huh-7细胞中shSIRT6-1和shSIRT6-2组的细胞凋亡比例明显升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 图3)。此结果提示, *SIRT6*基因沉默可诱导人肝癌细胞凋亡。

2.4 *SIRT6*基因沉默抑制人肝癌细胞中*XIAP*基因的表达

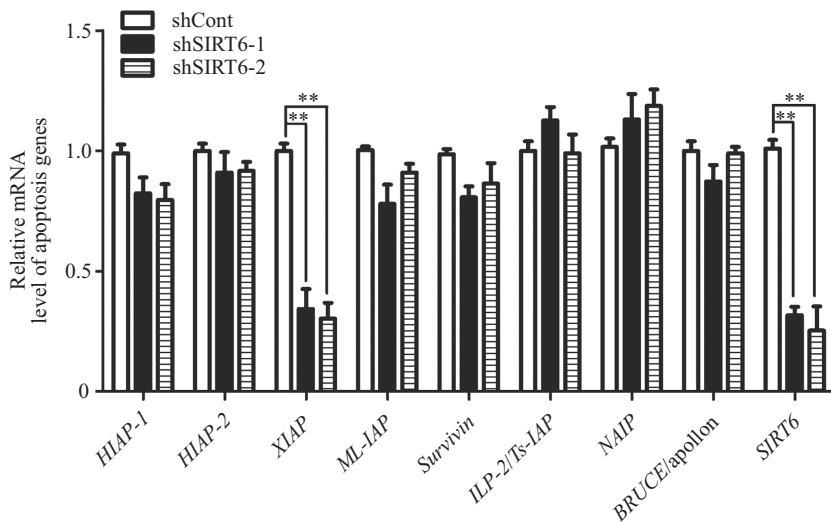
在细胞凋亡的信号转导中, 凋亡抑制蛋白(in-

hibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族成员是目前发现的与调控细胞凋亡相关的重要因子, X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein gene, *XIAP*)是近年来发现的具有强烈抑制凋亡作用的基因, 被认为是最有潜力的治疗靶点。为了阐释 *SIRT6* 对人肝癌细胞凋亡影响的分子机制, 我们在肝癌细胞SK-Hep-1上感染表达shCont、shSIRT6-1、shSIRT6-2的慢病毒, 72 h后提取RNA, 应用RT-PCR检测IAPs家族成员的mRNA水平。结果显示, 与shCont组相比, shSIRT6-1和shSIRT6-2组 *XIAP* mRNA水平分别降低66%和70%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 而对其他成员, mRNA水平未见明显影响(图4); 同时, Western blot检测发现, 沉默 *SIRT6* 可以

下调 *XIAP* 蛋白质水平(图5)。

2.5 *SIRT6*基因沉默通过下调 *XIAP*基因表达诱导肝癌细胞凋亡

为了进一步证明 *XIAP* 在 *SIRT6* 调控细胞凋亡过程中发挥的作用, 我们在SK-Hep-1细胞上沉默 *SIRT6* 基因并同时过表达 *XIAP*, 通过Western blot证实, *SIRT6* 基因沉默和 *XIAP* 过表达都是有效的(图6)。进一步应用流式细胞术发现, shCont+pCMV6-XL5、shSIRT6+pCMV6-XL5、shSIRT6+pCMV6-XL5-*XIAP* 和 shCont+pCMV6-XL5-*XIAP* 组的细胞凋亡比例分别为 $(12.70 \pm 2.04)\%$ 、 $(26.50 \pm 2.64)\%$ 、 $(12.20 \pm 1.20)\%$ 和 $(12.90 \pm 2.26)\%$ 。这提示, 沉默 *SIRT6* 可以显著诱导SK-Hep-1细胞凋亡 ($P < 0.01$), 在此基础上过表达



** $P < 0.01$, 与shCont组比较。

** $P < 0.01$ vs shCont group.

图4 RT-PCR检测沉默 *SIRT6* 基因对SK-Hep-1细胞中IAPs家族mRNA水平的影响

Fig.4 Effects on mRNA levels of IAPs family in *SIRT6*-depleted SK-Hep-1 detected by RT-PCR

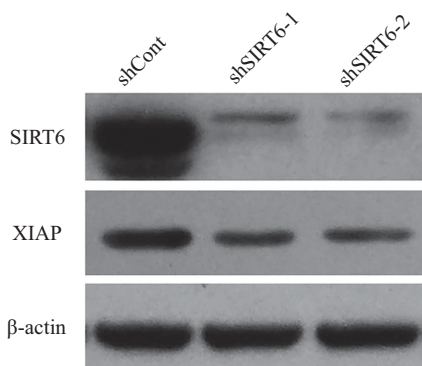


图5 Western blot检测沉默 *SIRT6* 基因对 *XIAP* 蛋白质水平的影响

Fig.5 Effects of *SIRT6* gene silencing on protein levels of *XIAP* detected by Western blot

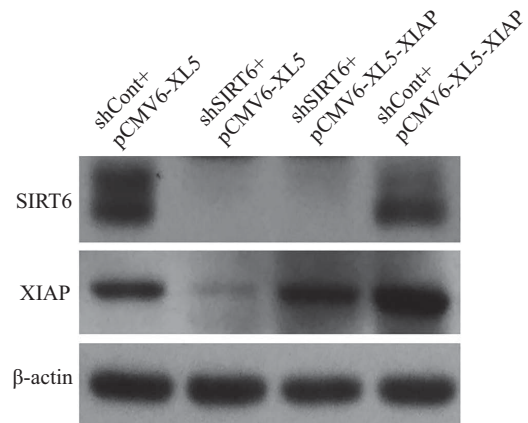
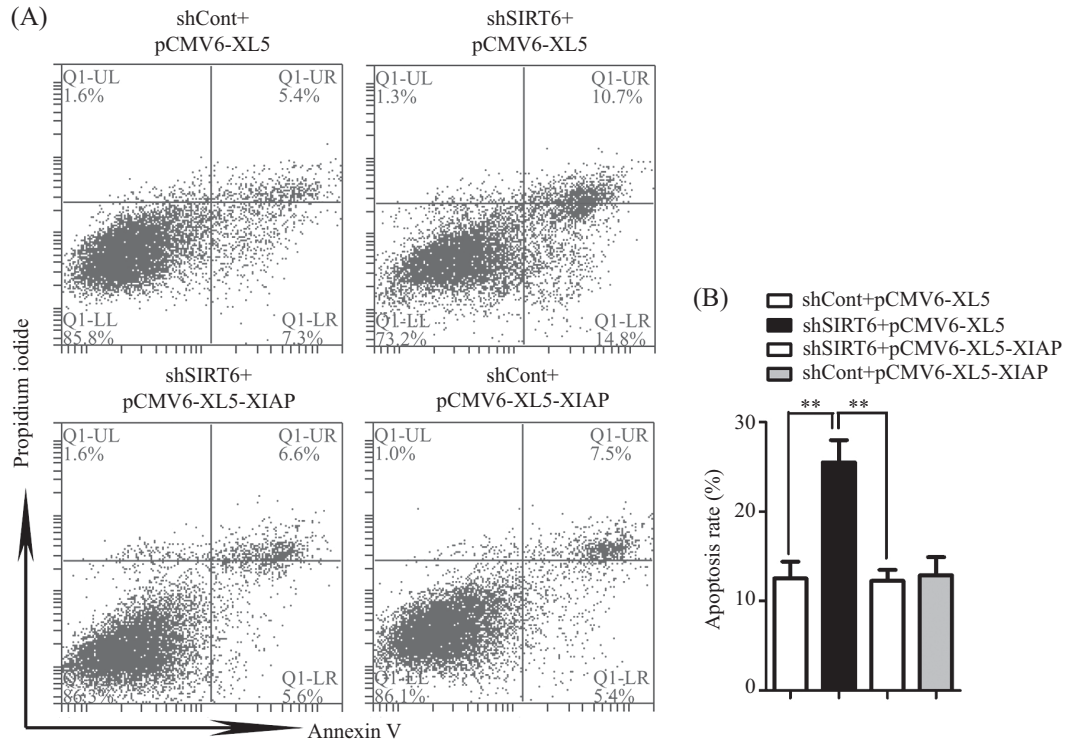


图6 Western blot检测 *SIRT6*、*XIAP* 表达水平
Fig.6 The expression of *SIRT6* and *XIAP* detected by Western blot



A: 流式细胞仪检测细胞凋亡散点图; B: 凋亡细胞比例图; ** $P < 0.01$, 与shSIRT6+pCMV6-XL5组比较。

A: representative scatter plot detecting apoptosis by flow cytometry; B: percentage of apoptotic cells; ** $P < 0.01$ vs shSIRT6+pCMV6-XL5 group.

图7 过表达XIAP对SIRT6基因沉默诱导的肝癌细胞凋亡的影响

Fig.7 Effects of XIAP over-expression on the induction of apoptosis in SIRT6-depleted SK-Hep-1 detected by flow cytometry

XIAP后, 肝癌细胞的凋亡比例明显减少($P < 0.01$, 图7)。以上实验说明, 过表达XIAP可以拮抗SIRT6基因沉默诱导的肝癌细胞凋亡。

3 讨论

Sirtuin蛋白质家族是一类从细菌到人类进化过程中都保持高度保守并依赖于NAD⁺的组蛋白去乙酰基转移酶^[8], 在人体内发挥着重要的生物学作用, 如调节基因的表达、调控衰老^[9]与能量代谢^[10]、DNA的损伤修复^[5]等。尽管近年来Sirtuin蛋白质家族已经成为各类研究的热点, 但由于其作用的底物和功能在不同物种中不尽相同, 因而许多具体的功能机制仍不清楚。其中, SIRT6在肿瘤的作用越来越引起人们的注意, Sebastian等^[11]发现, 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)在SIRT6缺失时可不依赖于致癌基因而发生肿瘤; van Meter等^[12]证明, SIRT6过表达后通过其单ADP核糖基转移酶活性杀伤纤维肉瘤细胞和人宫颈癌细胞, 但并不影响正常细胞, 提示SIRT6是一个抑癌基因。然而也有部分研究提示, SIRT6是一个潜在的促癌基因。Wang等^[13]发现, 慢性淋巴细胞白血病中SIRT6

表达水平明显上升, 其水平与预后不良程度成正相关; Lefort等^[14]和Ming等^[15]均证实, 在鳞状细胞癌中, 高表达的SIRT6可通过调节COX-2的表达抑制腺苷酸活化蛋白激酶途径, 进而促进细胞增殖和皮肤癌的发生; 与正常或癌旁组织相比, SIRT6在前列腺癌^[16]组织和细胞中均高表达, 而将人前列腺癌细胞中SIRT6敲除后可使细胞周期阻滞, 增强细胞凋亡和DNA损伤水平, 减少凋亡抑制基因Bcl-2的表达。因此, SIRT6在人类复杂的遗传背景中既可能是抑癌基因也可能是促癌基因。

目前, SIRT6在肝癌中的作用仍存在争议。一方面, Marquardt等^[17]通过分析Oncomine Cancer公共芯片数据库发现, SIRT6 mRNA水平在肝硬化和肝癌组织中比非肝硬化组织显著降低。通过分析SIRT6基因缺失的小鼠原代肝细胞发现, SIRT6基因缺失使肿瘤标志物甲胎蛋白(α -fetoprotein, α FP或AFP)、胰岛素样生长因子2(insulin-like growth factor 2, IGF2)、母源性印记基因H19(maternal imprinting gene H19)等表达明显升高, 但其未在临床肝癌病人样本、人肝癌细胞系和原代肝细胞中进行SIRT6 mRNA和蛋白质水平的验证, 也未分析SIRT6在肝癌发生、发展中

的功能和机制。除此之外,即刻早期基因(immediately early genes) *c-Fos*通过诱导*SIRT6*基因转录,从而抑制survivin的表达并促进肝癌细胞凋亡^[18]。*SIRT6*通过下调ERK1/2的磷酸化水平从而抑制肝癌细胞的生长^[19]。hMOF可结合到*SIRT6*基因启动子上,通过增强*SIRT6*基因转录活性并抑制其下游靶基因的表达,从而抑制肝癌细胞的生长^[20]。另一方面, Feng等^[21]发现, *SIRT6*通过抑制细胞衰老而促进TGF- β 1(transforming growth factor- β 1)/H₂O₂/HOCl介导肝癌的发生,而TGF- β 1/H₂O₂/HOCl通过激活ERK和Smad信号通路上调肝癌细胞*SIRT6*基因的表达。综上所述, *SIRT6*在肿瘤中的作用可能与不同的组织背景、不同的肿瘤微环境、甚至肿瘤发生的不同阶段等有关。本研究通过Western blot检测发现,在人肝癌细胞系(SK-Hep-1、Huh-7、PLC/PRF/5、HepG2)中*SIRT6*基因表达水平较正常永生化肝细胞(MIHA)升高,沉默*SIRT6*基因表达后,肝癌细胞的凋亡水平增加,那么其诱导细胞凋亡的机制是什么呢?

在肿瘤中基因凋亡机制受阻或者调节异常,被认为是一种潜在的肝癌发生机制^[22],而抗凋亡和促凋亡因素间的失衡就是其中一个重要事件,肿瘤细胞凋亡通路的缺失会阻碍抗癌药物的治疗效果。有文献报道,在纤维肉瘤、宫颈癌、原发性乳腺癌和转移性乳腺癌中发现, *SIRT6*通过激活p53和p73等细胞凋亡信号级联反应诱导凋亡^[12];另外,在前列腺癌中沉默*SIRT6*基因可诱导肿瘤细胞凋亡并增加其对化疗药物敏感性^[23]。而本研究发现,沉默*SIRT6*基因可下调X连锁凋亡抑制因子XIAP mRNA和蛋白质水平,提示*SIRT6*可以调控XIAP基因的表达;进一步在沉默*SIRT6*基因的基础上过表达XIAP基因后,发现肝癌细胞的凋亡水平减少,提示XIAP可以拮抗*SIRT6*基因沉默所诱导的肝癌细胞凋亡。XIAP是凋亡抑制蛋白(IAPs)家族中抑制凋亡最具代表性的基因,有研究证明, XIAP基因在多种恶性肿瘤中都有表达,其异常表达与肿瘤的发生发展、组织学类型、预后及对放化疗的抵抗密切相关^[24-25]。癌细胞内XIAP基因高表达可以通过调控凋亡级联反应的上游间接调控caspase的活性,选择性抑制caspase-3、caspase-7、caspase-9,从而使细胞免于各种刺激引发的细胞凋亡^[26]。而在肝癌中,靶向沉默XIAP基因可以抑制肝癌细胞的活率,并增加其对甲氨蝶呤的敏感性^[27];另外, HtrA丝氨酸蛋白酶1(HtrA serine pepti-

dase 1, HTRA1)通过调控XIAP基因表达拮抗肝癌细胞的多重耐药性^[28]。在本研究中, *SIRT6*虽然是一个去乙酰基酶,但其去乙酰基酶活性可能并没有直接作用于XIAP上,而是通过其他途径间接发挥作用。有研究显示, PI3K/Akt信号通路能促进XIAP基因表达^[29-30], *SIRT6*也能参与PI3K/Akt信号通路的调控,影响Akt的磷酸化水平^[31]。因此我们猜想,在肝癌中*SIRT6*可能通过正向调控PI3K/Akt通路,增加p-Akt的水平,促进XIAP基因表达,从而减少肝癌细胞发生凋亡。

那么,沉默*SIRT6*基因是否通过调控XIAP相关信号通路从而影响肝癌细胞凋亡呢?本课题组将进一步深入研究*SIRT6*基因沉默与肝癌细胞凋亡的分子机制,从而为肝癌的基因治疗提供新的分子靶点。

参考文献 (References)

- 1 Kennedy AS, Sangro B. Nonsurgical treatment for localized hepatocellular carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2014; 16(3): 373.
- 2 Lee JH, Chung YH, Kim JA, Shim JH, Lee D, Lee HC, *et al.* Genetic predisposition of hand-foot skin reaction after sorafenib therapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2013; 119(1): 136-42.
- 3 Flick F, Lüscher B. Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. *Front Pharmacol* 2012; 3: 29.
- 4 Herskovits AZ, Guarente L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Res* 2013; 23(6): 746-58.
- 5 Gertler AA, Cohen HY. SIRT6, a protein with many faces. *BioGerontology* 2013; 14(6): 629-39.
- 6 Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, *et al.* SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 2008; 452(7186): 492-6.
- 7 Pan PW, Feldman JL, Devries MK, Dong A, Edwards AM, Denu JM. Structure and biochemical functions of SIRT6. *J Biol Chem* 2011; 286(16): 14575-87.
- 8 Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 2009; 460(7255): 587-91.
- 9 Guarente L, Partridge L, Wallace DC. *Molecular Biology of Aging*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 2008.
- 10 Imai S, Guarente L. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: Implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31(5): 212-20.
- 11 Sebastián C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, *et al.* The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* 2012; 151(6): 1185-99.
- 12 van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle* 2011; 10(18): 3153-8.
- 13 Wang J, Kafel M, Avezbakiyev B, Chen C, Sun Y, Rathnasabapathy C, *et al.* Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* 2011; 81(5/6): 325-9.

- 14 Lefort K, Brooks Y, Ostano P, Cario-André M, Calpini V, Guinea-Viniegra J, *et al.* A miR-34a-SIRT6 axis in the squamous cell differentiation network. *EMBO J* 2013; 32(16): 2248-63.
- 15 Ming M, Han W, Zhao B, Sundaresan NR, Deng CX, Gupta MP, *et al.* SIRT6 promotes COX-2 expression and acts as an oncogene in skin cancer. *Cancer Res* 2014; 74(20): 5925-33.
- 16 Liu Y, Xie QR, Wang B, Shao J, Zhang T, Liu T, *et al.* Inhibition of SIRT6 in prostate cancer reduces cell viability and increases sensitivity to chemotherapeutics. *Protein Cell* 2013; 4(9): 702-10.
- 17 Marquardt JU, Fischer K, Baus K, Kashyap A, Ma S, Krupp M, *et al.* Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* 2013; 58(3): 1054-64.
- 18 Min L, Ji Y, Bakiri L, Qiu Z, Cen J, Chen X, *et al.* Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat Cell Biol* 2012; 14(11): 1203-11.
- 19 Zhang ZG, Qin CY. SIRT6 suppresses hepatocellular carcinoma cell growth via inhibiting the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol Med Rep* 2014; 9(3): 882-8.
- 20 Zhang J, Liu H, Pan H, Yang Y, Huang G, Yang Y, *et al.* The histone acetyltransferase hMOF suppresses hepatocellular carcinoma growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452(3): 575-80.
- 21 Feng XX, Luo J, Liu M, Yan W, Zhou ZZ, Xia YJ, *et al.* Sirtuin 6 promotes transforming growth factor- β 1/H₂O₂/HOCl-mediated enhancement of hepatocellular carcinoma cell tumorigenicity by suppressing cellular senescence. *Cancer Sci* 2015; 106(5): 559-66.
- 22 Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisaack DD, *et al.* The histone deacetylase SIRT6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell* 2010; 140(2): 280-93.
- 23 Fabregat I, Roncero C, Fernández M. Survival and apoptosis: A dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 2007; 27(2): 155-62.
- 24 Notarbartolo M, Cervello M, Poma P, Dusonchet L, Meli M, D'Alessandro N. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. *Oncol Rep* 2004; 11(1): 133-6.
- 25 Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, Vasconcelos MH. Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2004; 11(5): 309-16.
- 26 Wu W, Wan OW, Chung KK. S-nitrosylation of XIAP at Cys 213 of BIR2 domain impairs XIAP's anti-caspase 3 activity and anti-apoptotic function. *Apoptosis* 2015; 20(4): 491-9.
- 27 Chen J, Xiao XQ, Deng CM, Su XS, Li GY. Downregulation of XIAP expression by small interfering RNA inhibits cellular viability and increases chemosensitivity to methotrexate in human hepatoma cell line HepG2. *J Chemother* 2006; 18(5): 525-31.
- 28 Bao W, Zhu F, Duan Y, Yang Y, Cai H. HtrA1 resensitizes multi-drug-resistant hepatocellular carcinoma cells by targeting XIAP. *Biomed Pharmacother* 2015; 70: 97-102.
- 29 Kwon DS, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK. Signal transduction of MEK/ERK and PI3K/Akt activation by hypoxia/reoxygenation in renal epithelial cells. *Eur J Cell Bio* 2006; 85(11): 1189-99.
- 30 Hu P, Han Z, Couvillon AD, Exton JH. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2004; 279(47): 49420-9.
- 31 Xiao C, Kim HS, Lahusen T, Wang RH, Xu X, Gavrilova O, *et al.* SIRT6 deficiency results in severe hypoglycemia by enhancing both basal and insulin-stimulated glucose uptake in mice. *J Biol Chem* 2010; 285(47): 36776-84.